

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390385

研究課題名（和文） 拡張型心筋症に対する集学的左心補助法の研究

研究課題名（英文） The basic research of multidisciplinary support for impaired left ventricle with dilated cardiomyopathy

研究代表者 坂田 隆造 (SAKATA RYUZO)

京都大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：20325781

研究成果の概要（和文）：

我々はまず、自己免疫性拡張型心筋症ラットの不全心を、健常ラットの腹部大動脈に異所性移植したモデルを用いて、長期補助循環が及ぼす生理学的、組織学的変化の検討を行った。その結果、長期補助循環が心収縮力を改善し、カテコラミンに対する反応性を上昇させることを示した一方、長期補助循環は拡張能を悪化させ、心筋のアポトーシスを助長するという結果を得た。以上より拡張型心筋症に対する長期補助循環は「橋渡し」としての役割は果たすが、心筋に対しては悪影響を及ぼしていると考えた。また同時に我々は、左室形成術後のリモデリングに対する $\beta$ 遮断薬投与の抑制効果を示した。このことは長期補助循環に何らかの心保護的薬剤治療を併用することにより、心筋への悪影響を抑えることができる可能性を示している。これらを受けて、サイトカイン徐放を拡張型心筋症ラットに行うことで、心筋自体への悪影響を抑えられるかどうかを検討した。強い抗線維化・抗アポトーシス作用を有する肝細胞増殖因子(HGF)含浸ゼラチンハイドロゲルの自己免疫性拡張型心筋症ラット不全心表面への局所投与により、心筋障害を抑えられるか検討したところ、投与群において心機能の回復を認め、アポトーシス及び線維化抑制の傾向を認めたことから、長期補助循環へのサイトカイン徐放併用という戦略は拡張型心筋症治療において有望であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

We first assessed the physiological and histological effect of prolonged circulatory support using heterotopic rat heart transplantation model, in which failing heart with auto-immune dilated cardiomyopathy model rat heart was transplanted to abdominal aorta of normal rat. We found that prolonged circulatory support improves contractile function and enhances the responsibility to catecholamines, on the other hand, deteriorates diastolic function and increases apoptosis of myocardium. We supposed that prolonged circulatory support might be advantageous for "bridge to transplantation", however, disadvantageous for myocardium itself. Next, we showed that the administration of  $\beta$ -blocker after experimental left ventricular volume reduction surgery demonstrates the attenuation of left ventricular remodeling. This supports the possibility to attenuate the adverse effects of prolonged circulatory support when combined with the administration of cardioprotective reagents. Considering these results, we examined that sustained topical release of cardioprotective cytokines might attenuate the myocardial damage for dilated cardiomyopathy model rat heart. Hepatocyte growth factor, which possesses potent anti-fibrotic and anti-apoptotic effect, was topically administrated for dilated cardiomyopathy model rat heart with sustained release method using gelatin hydrogel. We found that the therapy improved cardiac function and showed tendency for decreased apoptosis and fibrosis. Taken together, we indicated that the combination of prolonged circulatory support and sustained release of cardioprotective cytokines would be a promising therapeutic strategy for dilated cardiomyopathy.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2010年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2011年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
総計	13,600,000	4,080,000	17,680,000

研究分野：外科学

科研費の分科・細目：胸部外科学、心臓血管外科学

キーワード：拡張型心筋症、左室補助心臓、異所性心移植、細胞移植、左室形成術

### 1. 研究開始当初の背景

難治性の拡張型心筋症には心臓移植しか現実的選択の余地がないが、本邦におけるドナー不足のため、移植の代替治療が強く求められている。左室補助装置は従来移植までの「橋渡し」とし機能していたが、ドナー不足の現状では、「橋渡し」としてではなく「回復および離脱」への方向性を模索する必要がある。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、左室補助人工心臓の集学的治療の基礎研究を行い、移植の代替医療として臨床応用を目指すことにある。

### 3. 研究の方法

(研究1) 拡張型心筋症による不全心に対する長期補助循環が及ぼす生理学および組織学的変化の基礎的検討

ブタミオシン皮下注入による自己免疫的機序により作製した拡張型心筋症モデルルイスラットを使用した。注入後6週経過し、心臓超音波検査にて壁運動低下を認めた個体を対象とした。

2群に分けて検討した：異所性心移植群(正常ルイスラットの腹部大動脈に、摘出した不全心の大動脈を縫着し、冠血流を保ったまま前負荷のみを除くことにより、左室補助装置をつけた心臓と同様の血行動態を実験的に再現した)、非移植群。移植後2週および4週にて評価した

評価項目：①乳頭筋刺激試験(乳頭筋を摘出、電気刺激を与えることで発生する張力および筋拡張時間を測定。さらにアドレナリン投与による変化を測定。②組織学的検査(シリウスレッド染色による線維化の評価およびTUNEL染色によるアポトーシスの評価)。③生化学検査(心臓組織のコラー

ゲン1aのmRNA発現をRT-PCRにて評価。

(研究2) 心保護的薬剤投与による左室リモデリング抑制効果の検討

ラット慢性心筋梗塞モデル(冠動脈結紮後4週)に対し左室縫縮手術を施したもの(外科的左室形成モデル)を使用した。

3群に分けて検討した：薬剤非投与群、カルベジロール( $\beta$ ブロッカー)低用量投与群、カルベジロール高容量投与群。

4週間経口投与を行い、心機能評価(エコー・カテーテル)・組織学的評価(シリウスレッド染色による線維化評価)・生化学的評価(TGF $\beta$ 1 mRNA発現をRT-PCRにて評価)を行った。

(研究3) 心保護的薬剤投与による拡張型心筋症に対する効果の検討

研究1と同様に拡張型心筋症ラットモデルを作製、対象とした。

2群に分けて検討した：HGF(肝細胞増殖因子)徐放投与群(HGF含浸ゼラチンハイドロゲルを心表面におき、2週間かけて徐々に放出させる)・非投与群(ゼラチンハイドロゲルのみ)

心機能評価(エコー・カテーテル)・組織学的評価(シリウスレッド染色による線維化評価)・生化学的評価(TGF $\beta$ 1およびコラーゲン1a mRNA発現をRT-PCRにて評価)・ELISAにて心臓組織におけるBax/Bcl2比を測定)を行った。

### 4. 研究成果

研究1の結果より、異所性心移植群(長期補助循環群)において乳頭筋刺激試験での高い発生張力(高い収縮能をもつことを示す)とアドレナリンに対する高い反応性を認めた。これらの所見は長期補助循環により収縮能が改善したことを示している。一方、乳頭筋

拡張時間は心移植群で有意に延長していた。また組織学的検査で心移植群が線維化高度であり、TUNEL染色では有意にアポトーシスが高頻度であった。生化学検査ではコラーゲン1aのmRNA発現が心移植群で高値であった。これらの所見は、補助循環が拡張能を障害し、線維化・アポトーシスを増加させていることを示している。

研究1の結果は、長期補助循環は移植までの「橋渡し」には十分であるものの、「回復および離脱」を目指すためには、心筋自体への悪影響を軽減するような治療を併用することが必要であることを示すものであった。

これを受けて開始した研究2の結果では、βブロッカー投与群では、心機能評価において収縮能には改善を認めなかったものの、拡張能の有意な改善が見られ、線維化を抑制し、TGFβのmRNA発現も抑えられた。

この研究2の結果は、研究1の長期補助群で認められた心筋への悪影響が出ている部分を、βブロッカーなど心保護的作用を持つ薬剤の投与により、きれいに補える可能性を示すものであった。

このような効果が拡張型心筋症の心臓にとっても同様に起こりうるかを検討するため開始した研究3では、HGF徐放投与により、心機能回復を示したのみならず、線維化抑制・アポトーシス抑制の傾向を示し、このことは拡張型心筋症の心臓においても、同様の心筋自体への長期補助による悪影響を抑えうることを示している。

我々はこれら一連の研究により、拡張型心筋症治療において、長期補助循環のみでは心筋自体への悪影響を考えると不十分であるものの、これにサイトカイン徐放併用を行うという、すなわち「集学的左室補助」という戦略は有望であると考え、今後臨床応用に向けてさらに検討を行う予定である。

#### 5. 主な発表論文等

① Muranaka H, Marui A, Tsukashita M, Wang J, Nakano J, Ikeda T, Sakata R, Prolonged mechanical unloading preserves myocardial contractility but impairs relaxation in rat heart of dilated cardiomyopathy accompanied by myocardial stiffness and apoptosis, Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, 査読有、In Press、2010、1-7

② Muranaka H, Marui A, Tsukashita M, Wang J, Nakano J, Ikeda T, Sakata R, Prolonged mechanical unloading preserves myocardial contractility but impairs relaxation in rat heart of dilated cardiomyopathy accompanied by myocardial stiffness and apoptosis, Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, 査読有、Oct;140(4)、

2010、916-922

③ Yoshikawa E, Marui A, Tsukashita M, Nisina T, Wang J, Muranaka H, Ikeda T, Komeda M, Carvedilol may alleviate late cardiac remodelling following surgical ventricular restoration, European Journal of Cardiothoracic Surgery, 査読有、Feb;37(2)、2010、362-367

④ Masumoto H et al, Pluripotent Stem Cell-Engineered Cell Sheets Re-Assembled with Defined Cardiovascular Populations Ameliorate Reduction in Infarct Heart, Stem Cells, 査読有、in press、2012、in press DDI:10.1002/stem.1089.

⑤ Yamazaki K et al, Protective effect of cardioplegia with poly (ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor against myocardial ischemia-reperfusion injury: in vitro study, J Enzyme Inhib Med Chem, 査読有、in press、2012、in press、DDI:10.3109/14756366

⑥ Takeda T et al, Topical application of a biodegradable disc with amiodarone for atrial fibrillation, Ann Thorac Surg, 査読有、91巻、2011、734-9、DDI:10.1016/j.athoracsur.2010.10.022 [雑誌論文] (計6件)

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://www.kyoto-cvs.com/g-shinfuzen.ht>

m1

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂田 隆造 (SAKATA RYUZO)  
京都大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：23325781

(2) 研究分担者

池田 義 (IKEDA TADASHI)  
京都大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号：40281092  
南方 謙二 (MINAKATA KENJI)  
京都大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号：60539675

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：